

重组蛋白的复杂二硫键鉴定方法

龙珍 齐英姿 祝翔

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键字：复杂二硫键，重组蛋白，Orbitrap，EThcD，ETciD，三级质谱，HCD

1. 引言

二硫键的连接与蛋白的空间结构和活性息息相关，因此，二硫键的鉴定是重组蛋白药物的质量评价项目之一。但一些重组蛋白的二硫键连接极其复杂，即使使用联合酶切，仍然存在包含多对二硫键的肽段组。传统的碰撞诱导解离（CID）分析无法碎裂二硫键，因此只能通过一级 m/z 推测肽段组中包含的二硫键数目。此外，包含多对二硫键的肽段组往往分子量较大，面对分子量较大的肽段组，CID 碎裂效果较差，导致二级碎片少，序列鉴定困难。高能碰撞解离（HCD）可以为这样的肽段获得丰富的碎裂，但 HCD 也以碎裂肽键为主，难以碎裂二硫键，所以仍然无法确定这些肽段的二硫键连接方式。电子转移解离（ETD）是一种更倾向于断裂链间二硫键的碎裂方式。通过 ETD 碎裂可以获得链间二硫键碎裂后的肽段信息，但仅有 ETD 难以鉴定二硫键断裂后的肽段序列。赛默飞的三合一质谱^[1, 2]可将 ETD 和 CID/HCD 结合起来，不仅鉴定二硫键的连接，还可以通过三级质谱鉴定链间二硫键碎裂后的肽段序列，最终实现包含复杂二硫键肽段的鉴定。

在上一篇二硫键的鉴定应用报告“基于 ETD 和三级高分辨质谱的多肽复杂二硫键鉴定方法”中，我们介绍了多肽的复杂二硫键鉴定方法。相对于多肽的复杂二硫键鉴定，重组蛋白

的复杂二硫键鉴定具有更多的挑战，例如酶切效率、漏切、二硫键肽段与非二硫键肽段共流出、同时鉴定多对二硫键等。本文以牛血清白蛋白（BSA）为样品，介绍重组蛋白的复杂二硫键鉴定思路。BSA 具有 35 个氨基酸，17 对二硫键，仅使用 trypsin 酶切，将得到 8 组包含两对二硫键的肽段组（图 1）和 1 组包含一对二硫键的肽段组。本文重点介绍使用 EThcD/ETciD 实现复杂二硫键解析的流程（图 2）及实验过程中可能遇到的问题，以期类似分析带来一些启示和帮助。

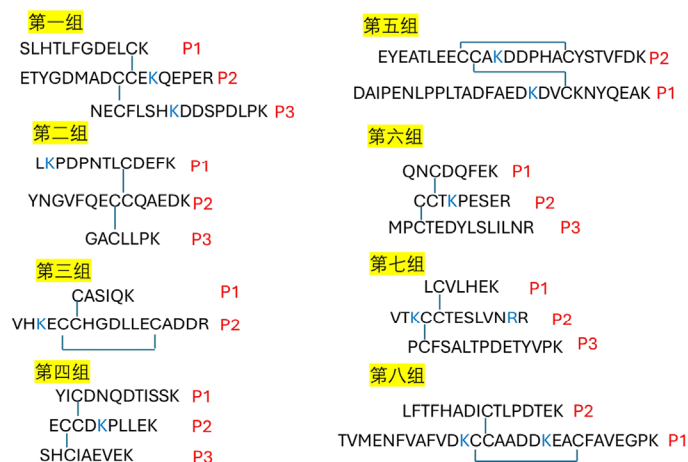


图1 BSA的八组二硫键理论连接

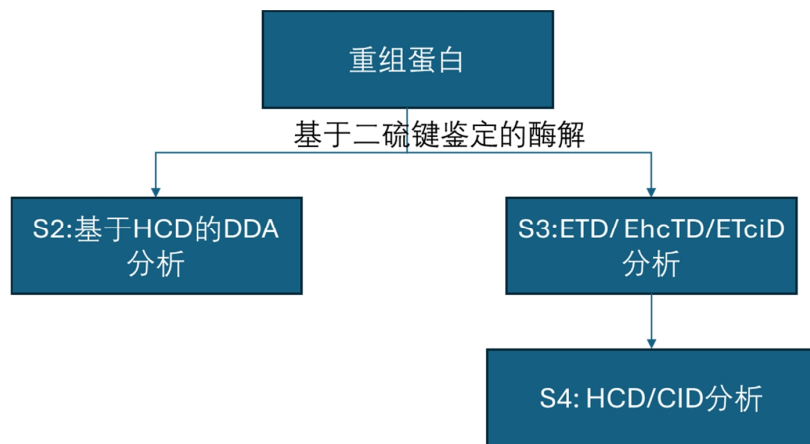


图2 重组蛋白的复杂二硫键鉴定流程

2. 实验部分

取适量样品用 pH 6.5 的 tris-HCl 溶解；加入 NEM（终浓度为 2 mM），37℃，孵育 2 h；用 10 kDa 滤膜超滤，pH 6.5 的 tris-HCl 复溶；加入测序级 trypsin (1:50)，37℃，孵育过夜；加入终浓度 1%FA 酸化，做二硫键分析。

3. 仪器及方法

质谱仪器：Orbitrap Eclipse™ Tribrid™；

色谱仪器：Vanquish Neo 液相色谱系统；

3.1 仪器方法

1) NanoLC-EThcD 分析

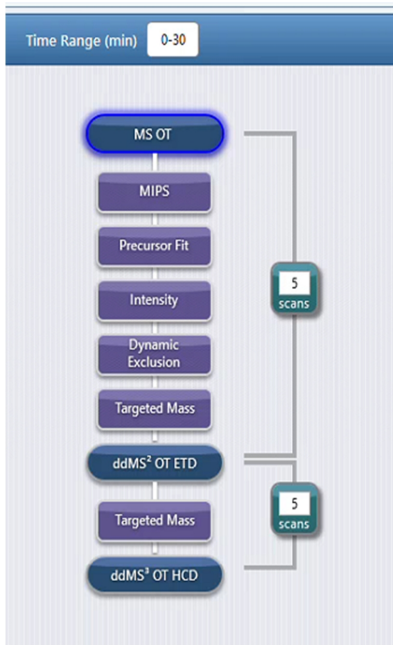
分析柱：Acclaim PepMap™ 100Å 75 μm x 250 mm, 2 μm, 货号 164941；柱温：室温（如果有柱温箱，设置 50 °C 柱温，保留时间稳定性和峰型会更好）；流动相：A: 0.1% FA- 水；B: 0.1% FA: 乙腈（20:80, v/v）；上样压力：1000 bar；分析流速：0.3 μL/min；上样量：1 μL。

分析泵梯度：

时间 (min)	B/%
0	2
2	4
44	22
52	35
54.5	55
55	99
60	99

质谱条件：

1) 质谱流程和源区参数



检测模式	+
喷雾电压	2.3 kV
毛细管温度	320℃

一级质谱参数信息：

MS Scan Properties		Show Favorites
Detector Type	Orbitrap	★
Orbitrap Resolution	120000	★
Mass Range	Normal	★
Use Quadrupole Isolation	☒	★
Scan Range (m/z)	200-1000	★
RF Lens (%)	30	★
AGC Target	Standard	★
Maximum Injection Time Mode	Auto	★
Microscans	1	★
Data Type	Profile	★
Polarity	Positive	★
Source Fragmentation	☐	★
Scan Description		★

二级、三级质谱参数和 target mass 信息见具体二硫键分析章节。

4. 数据采集及分析

Thermo Xcalibur Qual Browser 定性浏览器

BioPharma Finder 5.2

5. 结果与讨论

5.1 理论二硫键的连接验证

不同来源的 BSA 序列有微小的差异，这些差异从分子量分析中可以看出来。例如有一些 BSA 供应商提供的 BSA 序列来源于 Uniprot（P02769），但分子量检测结果显示二者存在差异（或许是对 Uniprot 中的 BSA 序列做了某个氨基酸的替换）。在这样的情况下，由于难以确定差异的来源，可以先做酶解，然后检测理论二硫键。如果所有理论二硫键均可检出，说明该差异氨基酸不包含在二硫键所在肽段区域，可以用 Uniprot 提供的序列继续做后续的二硫键分析。如果存在某些二硫键不能检出，需要对该蛋白做还原烷基化，然后采集肽谱做 denovo 分析，检测出差异位点，然后再做二硫键的分析。本文所用 BSA 所有理论二硫键均可检出，检出结果如表 1 所示。每一组二硫键均有多个价态和多种肽段组合检出（酶切位置不同导致）。在这些肽段中，83.3% 的肽段质量偏差在 2 ppm 以内，95.8% 的肽段质量偏差在 3 ppm 以内，所有肽段质量偏差在 4 ppm 以内。由于 HCD 的高能碎裂能力，所有二硫键肽段组均可以获得丰度的二级碎片（具体见 5.2 节）。

表1 基于HCD的DDA分析BSA 8组二硫键肽段

Peptide Sequence	M/Z	Site	Δ ppm
ETYGDMADCCEKQEPER/SLHTLFGDELCK/NECFLSHKDDSPDLPK	868.715	1:~C114,~C115/1:C99/1:C125	-0.8
YNGVFECCQAEDK/LKPDPTNLCDEFK/GACLLPK	770.960	1:~C191,~C192/1:C147/1:C200	3.5
VHKECCHGDLLECADDR/CASIQK	518.430	1:~C268,~C269,~C276/1:C223	2.49
VHKECCHGDLLECADDR/CASIQK	647.785	1:~C268,~C269,~C276/1:C223	2.4
ECCDKPLLEK/YICDNQDTISSK/SHCIAEVEK	715.931	1:~C301,~C302/1:C288/1:C312	0.33
ECCDKPLLEK/YICDNQDTISSK/SHCIAEVEK	596.777	1:~C301,~C302/1:C288/1:C312	0.12

Peptide Sequence	M/Z	Site	Δ ppm
YNGVFQECCQAEDKGACLLPK/LKPDPNTLCDEFKADEK	713.499	1:~C191,~C192,~C200/1:C147	0.95
YNGVFQECCQAEDKGACLLPK/LKPDPNTLCDEFKADEK	855.998	1:~C191,~C192,~C200/1:C147	2.55
YNGVFQECCQAEDKGACLLPK/LKPDPNTLCDEFKADEK	1069.745	1:~C191,~C192,~C200/1:C147	-0.31
YNGVFQECCQAEDKGACLLPK/LKPDPNTLCDEFK	767.357	1:~C191,~C192,~C200/1:C147	0.85
EYEATLEECCAADDPHACYSTVFDK/DAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEA	857.956	1:~C383,~C384,~C392/1:C339	-0.67
EYEATLEECCAADDPHACYSTVFDK/DAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEA	1000.781	1:~C383,~C384,~C392/1:C339	-0.34
CCTKPESER/QNCDQFEK/MPCTEDYLSLILNR	746.333	1:~C460,~C461/1:C415/1:C471	-1.14
VGTRCCTKPESER/QNCDQFEK/MPCTEDYLSLILNR	828.982	1:~C460,~C461/1:C415/1:C471	-0.94
EYEATLEECCAADDPHACYSTVFDK/DAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEA	1040.978	1:~C383,~C384,~C392/1:C339	1.82
EYEATLEECCAADDPHACYSTVFDK/DAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEA	892.411	1:~C383,~C384,~C392/1:C339	1.82
VTKCCTESLVNRR/LCVLHEK/PCFSALTPDETYVPK	669.837	1:~C499,~C500/1:C484/1:C510	1.16
VTKCCTESLVNRR/LCVLHEK/PCFSALTPDETYVPK	803.603	1:~C499,~C500/1:C484/1:C510	0.67
SLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCEK/QEPERNECFLSHKDDSPDLPK	953.602	1:~C99,~C114,~C115/1:C125	2.5
SLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCEK/QEPERNECFLSHKDDSPDLPK	817.517	1:~C99,~C114,~C115/1:C125	1.05
SLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCEK/QEPERNECFLSHKDDSPDLPK	950.600	1:~C99,~C114,~C115,~C125	1.18
TMVENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPK/LFTFHADICTLPDTEK	998.060	1:~C581,~C582,~C590/1:C537	0.61
TMVENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPK/LFTFHADICTLPDTEK	831.885	1:~C581,~C582,~C590/1:C537	0.32
TMVENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPK/LFTFHADICTLPDTEK	713.188	1:~C581,~C582,~C590/1:C537	-0.47

5.2 基于 EThcD 和 HCD/CID 的三级质谱解析二硫键

理论上，ETD 碎裂即可打开链间二硫键，但不同的二硫键被碎裂需要的能量不同，有一些二硫键仅仅使用 ETD 碎裂无法获得良好的结果。在 ETD 的碎裂中，适当补充 HCD 碎裂或者 CID 碎裂，可以极大的提高 ETD 的碎裂效率。在 BSA 的二硫键鉴定中，ETD 选择 50 ms 的反应时间，加上 20% 的 HCD 碎裂，可以实现 8 组复杂二硫键肽段组良好的碎裂。在这些碎裂中，选一些典型的案例，分享如下。

5.2.1 二硫键碎片过程中出现重排

二硫键 C147-C192，C191-C200 所在的肽段组（图 3）在 EThcD 的碎裂中，P2 出现了丢失一分子 H₂ 的重排，这样的重排在文献中也有报道^[2]。该重排发生在 P1 与 P2 的二硫键断裂时。当 P2 与 P3 之间的二硫键断裂时并没有出现这样的重排。谱图中可以观察到 P2-2H，P3+P2-2H 和 P1+P2 的信号，但没有 P1+P2-2H 或者 P2+P3 的信号，证明了上述猜测。由于这样的重排会导致相应的半胱氨酸（C）出现 -2H 的现象，因此可以在三级谱图中通过相应的特征碎片离子推测二硫键的连接位置。

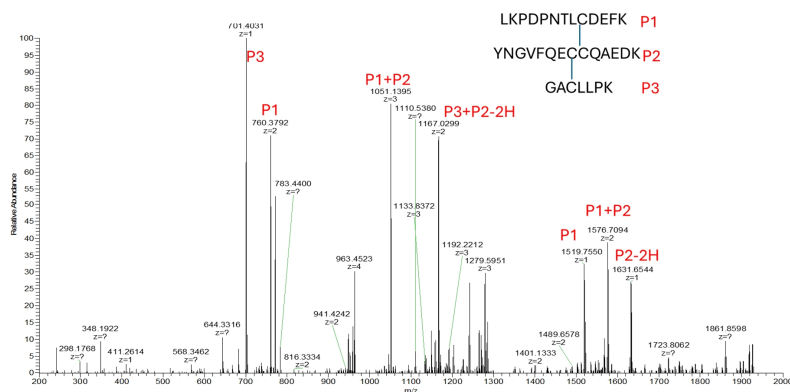


图3 EThcD碎裂C147-C192,C191-C200所在肽段。EThcD碎裂，ETD反应时间为50 ms，SA能量为20%。

如图 4 所示，母离子的响应强度对三级谱图的灵敏度影响较大。在本实验中，P3 具有较高的响应（E6），获得的三级谱图可以检测到丰富的 b、y 离子。相对于 P1 和 P3，P2-2H 的响应强度较低且肽段较长，所得谱图难以实现所有肽键的鉴定，但由于关键碎片 y7 的检测，可以推测与 P1 和 P3 连接的半胱氨酸位置分别为 C192 和 C191。综合一级、二级和三级质谱信息，可以推测改组二硫键的连接顺序为 C147-C192，C191-C200。

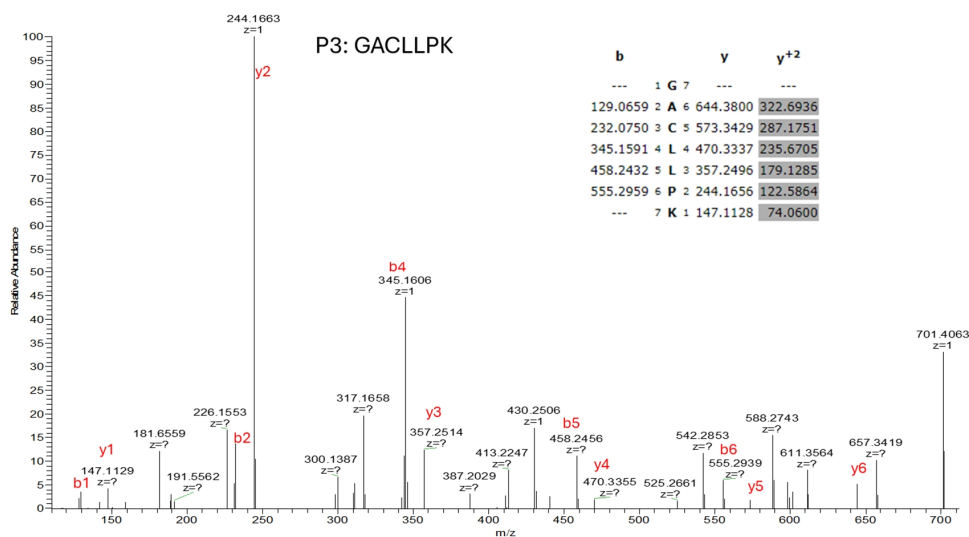
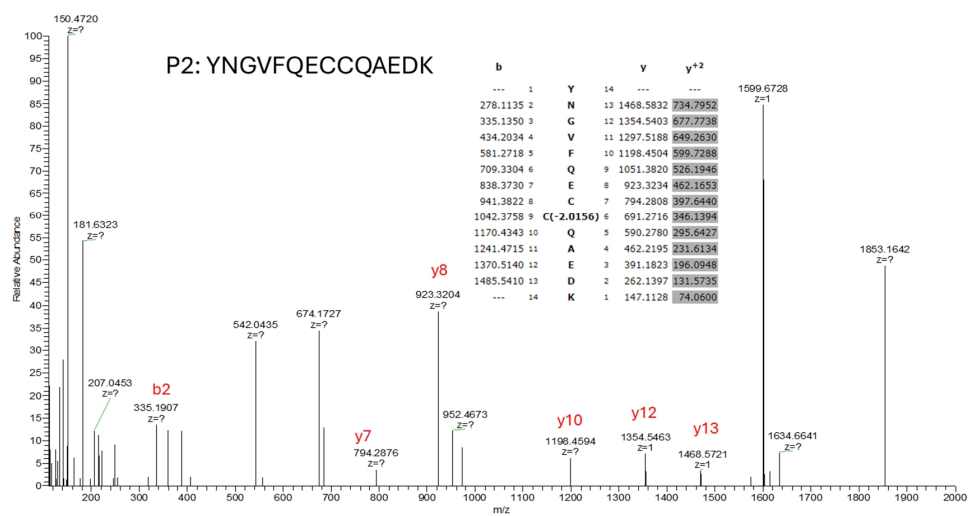
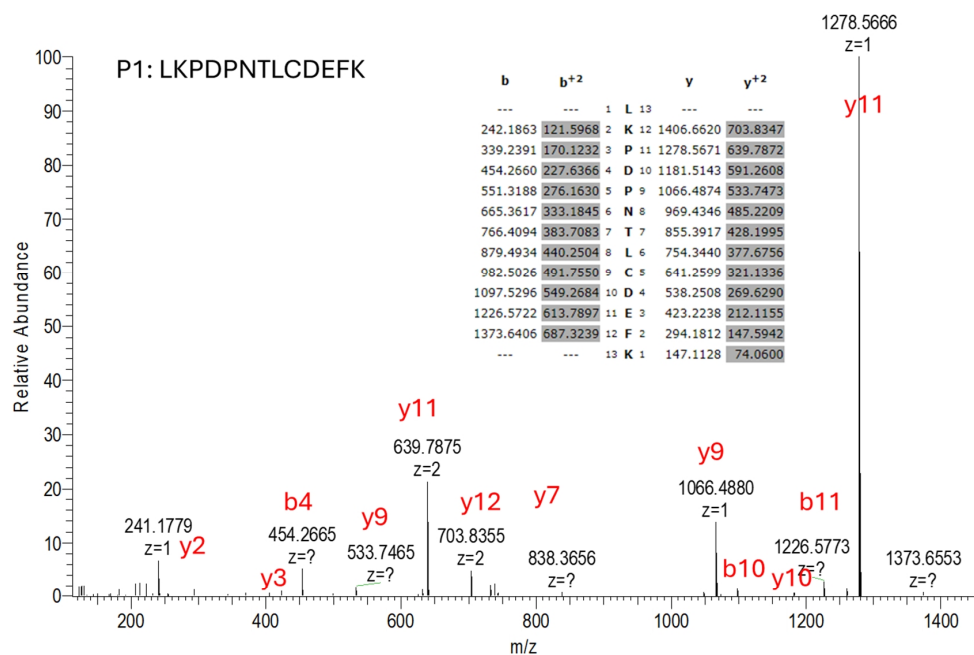


图4 二硫键C147-C192,C191-C200所在肽段组的三级碎裂。从上到下依次为P1、P2和P3。HCD能量为33%。

5.2.2 链间二硫键断裂，链内二硫键不断裂的分析

由于漏切，二硫键 C223-C269,C268-C276 所在肽段组没能完全切开，造成理论连接 C268-C276 以链内二硫键的形式存在，而 C223-C269 以链间二硫键的形式存在。在 ETD 的碎裂中，通常链内二硫键相对于链间二硫键更难碎裂，如图 5 所示。

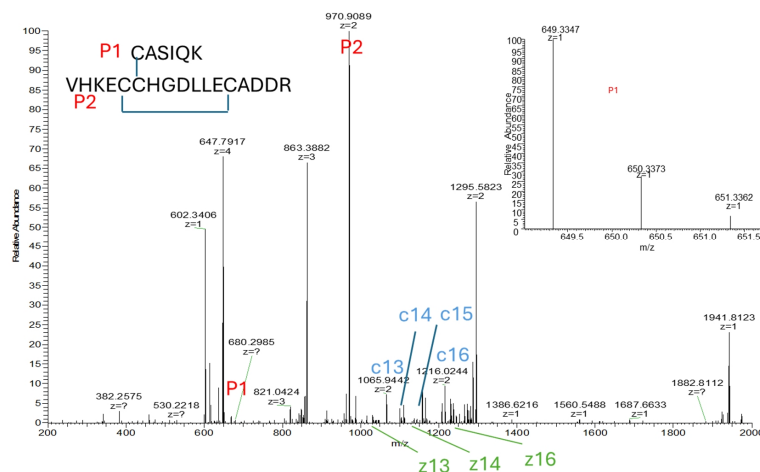


图5 EThcD碎裂C223-C269,C268-C276所在肽段组。EThcD碎裂，ETD反应时间为50 ms，SA能量为20%。

当 C268 与 C276 连接，268 与 278 之间的肽键难以碎裂，因此，无法检测到 y5-y12 的碎片。谱图 6 中没有 y12 离子，但可以检测到较高信号的 y13 离子。此外，在 EThcD 的二级谱图中也检测到大量的 C223-C269, C268-C276 连接产生的 c、z 离子，但未检测到 C223-C268, C269-C276 连接的相关碎片。因此，推测这组二硫键可能的连接方式是 C223-C269, C268-C276。

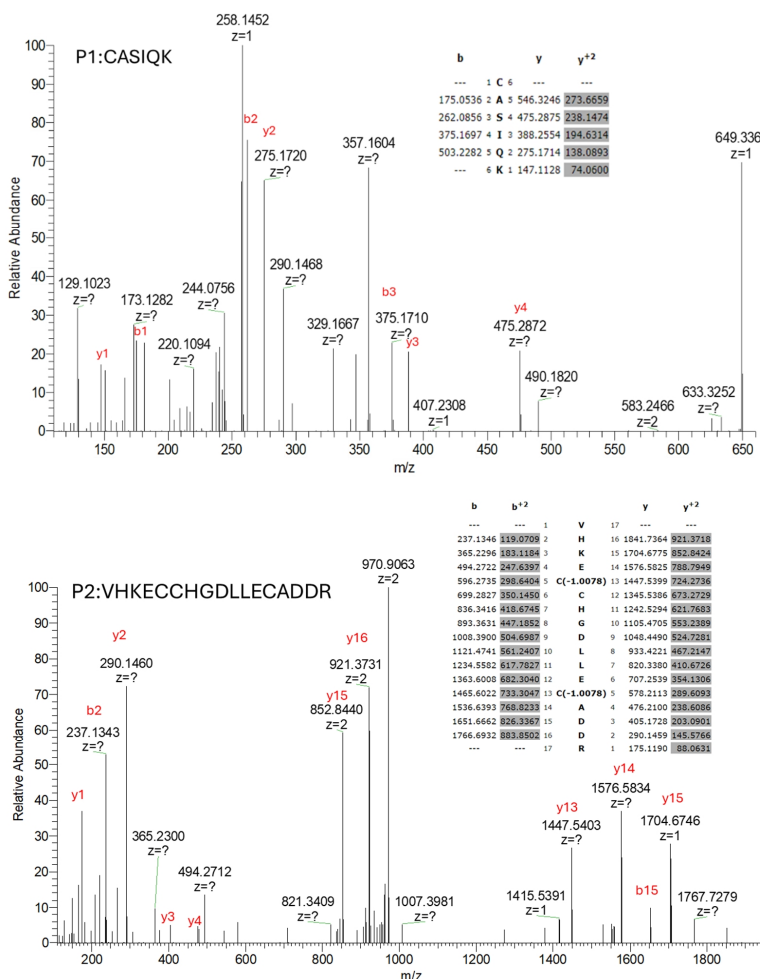


图6 二硫键C223-C269,C268-C276所在肽段组的三级碎裂。从上到下依次为P1和P2。HCD能量为33%。

5.2.3 二级谱图中容易碎裂的肽段

有一些肽段在 ETD/ETHcD/ETciD 碎裂二硫键的同时也容易发生二次碎裂，难以获得良好的三级谱图，但在二级谱图中可以找到相关的 c、z 离子碎片。如二硫键 C288-C302, C301-C312，在 ETHcD 碎裂时（图 7），可以获得 P1、P2-2H 和 P3 的碎裂，也可以获得只断裂一条二硫键后的碎片，如 P1+P2 和 P2-2H+P3。从只断裂一条肽段的信号推测，当 P1 与 P2 之间的二硫键断裂时容易出现重排。在三级质谱中，可以为 P1 和 P3 获得较好的谱图（图 8），但难以为 P2-2H 获得较好的谱图。分析二级谱图时发现，P2-2H 在二级质谱中发生了二次碎裂，可以在二级谱图中找到相关的碎片，其中 z9 和 z10 离子的出现，证明 P1 连在 C302 氨基酸残基上。综合一级、二级和三级信息，推测该组二硫键的连接位置为 C288-C302, C301-C312。

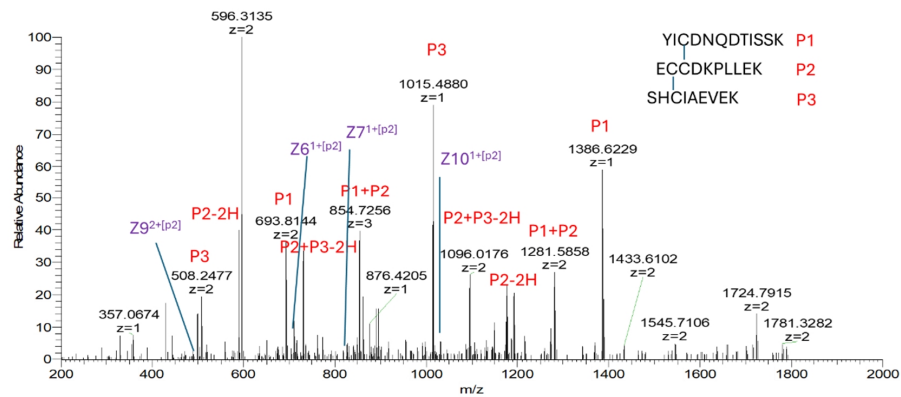


图7 基于ETHcD的二硫键肽段组（C288-C302, C301-C312）MS²分析。ETHcD碎裂，ETD反应时间为50 ms，SA能量为20%。

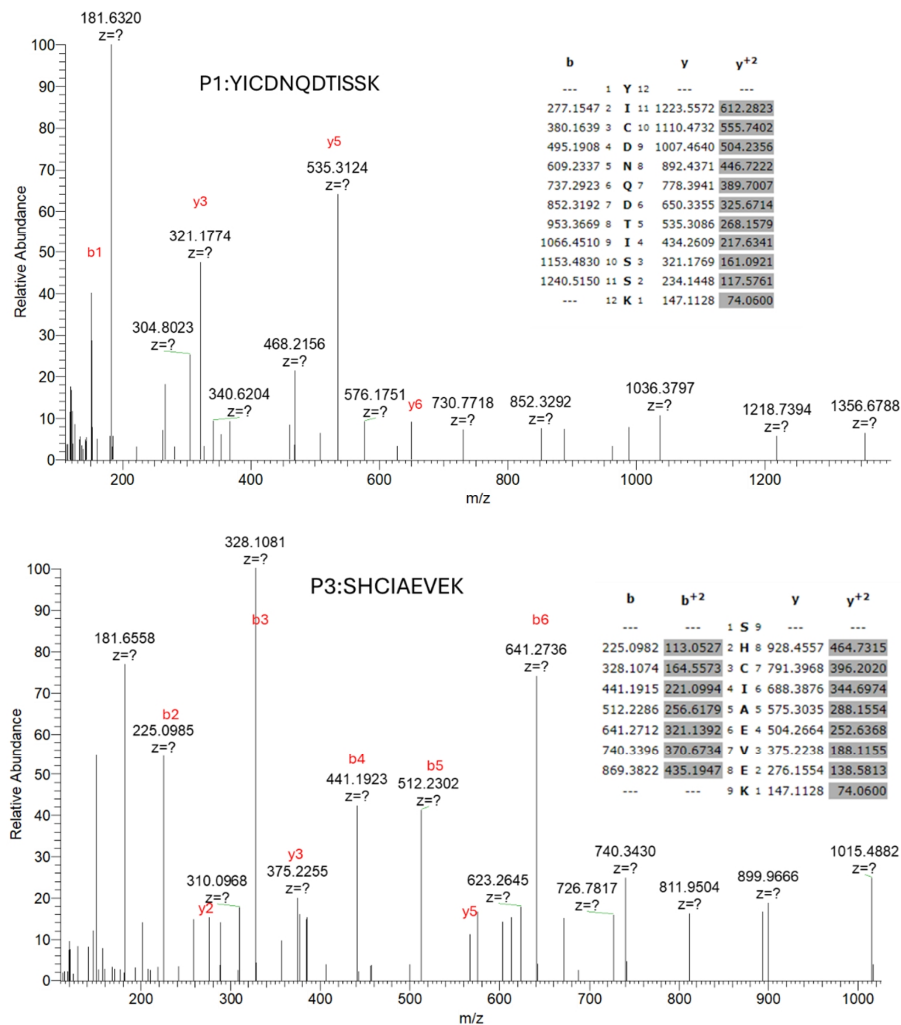


图8 基于HCD的P1(上)和P3(下)的MS³分析。HCD的能量为33%。

结论

Orbitrap 三合一质谱系列可配置多种碎裂方式，为复杂二硫键和肽段的修饰鉴定提供了丰富的碎片离子。三合一质谱的多级碎裂能力，为复杂二硫键的精准鉴定提供了可靠信息。同时，Orbitrap 的高灵敏度和高分辨率获得的高质量准确度和高信噪比的 MS1、MS2 和 MS3 谱图，是复杂二硫键鉴定的有力保障。

参考文献

- [1] C.N. Cramer, C.D. Kelstrup, J.V. Olsen, K.F. Haselmann, P.K. Nielsen, Complete Mapping of Complex Disulfide Patterns with Closely-Spaced Cysteines by In-Source Reduction and Data-Dependent Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 89 (2017) 5949-5957.
- [2] L.-J. Huang, C.-W. Chiang, S.-L. Chen, S.-Y. Wei, S.-H. Chen, Complete mapping of disulfide linkages for etanercept products by multi-enzyme digestion coupled with LC-MS/MS using multi-fragmentations including CID and ETD, *Journal of Food and Drug Analysis*, 27 (2019) 531-541.



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

thermo scientific